Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof.Dr.med. N.Henning

Über den Einfluss von Prednisolon, Nucleosiden und Aminoxydasehemmern auf die Serotoninbildung alternder Blutplättchen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen

Vorgelegt von
Barbara Pfannmüller
aus Nürnberg

1963

1964 M 35

R. GEW.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dekan: Professor Dr. A. Windorfer

Referent: Professor Dr. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 29.Juni 1963

nderdruck Reprint Tirage à part

THROMBOSIS ET DIATHESIS HAEMORRHAGICA

ITORES: K. M. BRINKHOUS, CHAPEL HILL; F. BÜCHNER, FREIBURG/BREISGAU; E. DEUTSCH, WIEN; J. E. JORPES, STOCKHOLM; F. KOLLER, ZÜRICH; J. ROSKAM, LIÈGE; J.-P. SOULIER, PARIS; I. S. WRIGHT, NEW YORK

DL. VII 15. V. 1962 NO. 3/4

Über den Einfluß von Prednisolon, Nucleosiden und Aminoxydasehemmern auf die Serotoninbildung alternder Blutplättchen* **

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. N. Henning)

E. Schmid, S. Witte, B. Pfannmüller und K. Th. Schricker

FRIEDRICH-KARL SCHATTAUER-VERLAG · STUTTGART

Die Alterung der Thrombozyten ist mit tiefgreifenden metabolischen Veränderungen, vor allem mit einem Verlust an energiereichem Phosphat und einer Aktivitätsabnahme glykolytischer Fermente verbunden (12, 19, 20, 40). Gleichzeitig geht die Retraktionsfähigkeit, die durch Einwirkung von ATP auf das Aktomyosin-ähnliche Plättchenprotein Thrombosthenin bedingt wird, verloren (4, 5, 20, 21). Für einen weiteren Thrombozytenfaktor, das Serotonin (5-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat, 5-HT), konnten wir kürzlich ebenfalls eine Abnahme des Plättchenamingehalts und eine verminderte Aufnahme von in vitro zugesetztem 5-HT durch die Thrombozyten im Laufe ihrer Alterung nachweisen (30, 35).

Nachdem somit mehrere Kriterien für die Beurteilung des Thrombozytenstoffwechsels verfügbar wurden, stellte sich die Frage, inwieweit Zusatzstoffe die Vitalitätsminderung alternder Blutplättchen in der Blutkonserve aufhalten können. G r o s s und Mitarb. (12, 20) fanden, daß Nucleoside gemeinsam mit reduziertem Glutathion und Nikotinsäureamid den ATP-Schwund und den Verlust der Fermentaktivitäten verzögern. B a l d i n i und Mitarb. (2, 3) beschrieben eine durch Inosin und Adenin gesteigerte Überlebensfähigkeit konservierter markierter Thrombozyten im Empfängerorganismus. Es lag daher nahe, den Einfluß von Nucleosiden in unserer Versuchsanordnung zu prüfen. Da ferner Glukokortikoide und Hemmstoffe der Monoaminoxydase die Aminbindung der Blutplättchen in vivo erhöhen (22, 25, 32, 33, 34), sollte die Wirkung dieser Substanzen auf die biologische Partialfunktion der Bindung und Speicherung von Serotonin während der Thrombozytenalterung ebenfalls untersucht werden.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Teilergebnisse wurden auf der 8. Tagg. der Europ. Ges. für Hämatol., Wien 1961 vorgetragen.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Methode

Von gesunden Blutspendern wurden je 2mal 250 ml Blut in nichtsilikonisierte handelsübliche Gefäße mit ACD-Stabilisator entnommen und bei + 4° C aufbewahrt. Während eine Blutkonserve jeweils als Kontrolle diente, wurden der zweiten sofort nach Blutabnahme eine der folgenden Substanzen zugefügt:

1. Prednisolon-Hemisuccinat (Solu-Decortin H)*, 0,1 mg/ml; 5 Blutkonserven.
2. Inosin*, 2 mg/ml; 5 Blutkonserven.
3. Inosin 2 mg/ml zusammen mit Adenin*, 0,1 mg/ml und Pyridoxol (Hexobion forte)*, 1 mg/ml; 3 Blutkonserven.
4. Iproniazid (Marsilid)*, 0,5 mg/ml bzw. Nialamid (Niamid)* 0,5 mg/ml und 0,01 mg/ml.
5. Serotonin (5-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat) 1,0 µg/ml.

Die weitere Aufarbeitung des Blutes erfolgte mit silikonisiertem Material. Aus plättchenreichem Plasma (gewonnen durch 20 min Zentrifugieren des Blutes bei 600 bis 800 r/min, Abpipettieren) wurden die Thrombozyten durch 10 min Zentrifugieren bei 3000 bis 4000/min isoliert. Der plättchenhaltige Niederschlag wurde mit Aqua dest. aufgelöst und bei —20° C eingefroren. In den Versuchen mit Serotoninzusatz wurde das Thrombozytensediment zuvor einmal mit physiologischer Kochsalzlösung und Zitratzusatz gewaschen. Vollblut, plättchenarmes Plasma und gelöste Thrombozyten wurden mit 95%igem Aceton versetzt und bei — 20° C aufbewahrt. Nach Kontrollversuchen konnten Verluste durch eine 8- bis 14tägige Aufbewahrung unter diesen Bedingungen vernachlässigt werden. 8 Stunden vor dem eigentlichen Versuch wurden die Proben bei 60° C annähernd bis zur Trockene eingeengt. Die Serotonin-Konzentrationen der mit Aqua dest. auf das urspüngliche Volumen gebrachten Extrakte ermittelten wir am isolierten Östrogen-sensibilisierten Rattenuterus mit Hilfe des sogenannten „Vier-Punkt-Verfahrens" (Technik s. 10, 14, 33). Insgesamt handelte es sich um etwa 500 Einzelbestimmungen. Die Zählung der Blutplättchen im Vollblut sowie im plättchenreichen und plättchenarmen Plasma erfolgte mit der Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop nach Feissly und Lüdin (11).

Ergebnisse

In Übereinstimmung mit eigenen früheren Untersuchungsergebnissen (30) sanken die Serotoninkonzentrationen alternder Blutplättchen innerhalb von 2 bis 3 Wochen auf etwa 1/4 des ursprünglichen Gehalts ab. Der Amingehalt des Vollblutes ließ während der Verlaufsbeobachtung ebenfalls einen allmählichen Abfall erkennen (Abb. 1). Wurde der Blutkonserve Prednisolon zugesetzt, so entsprachen die Ausgangswerte der Blut- und Thrombozyten-Serotoninspiegel den Kontrollen. Vom 3. bis 21. Tag nach Blutabnahme lagen die Plättchen-5-HT-Werte aus Konserven mit Glukokortikoidzusatz dagegen im Mittel um 30 bis 40% höher als die der Kontrollversuche (Abb. 1). Auch der Serotoningehalt des Vollblutes sank unter Prednisolon langsamer ab und betrug am 14. Tag im Mittel etwa das Doppelte der Aminmengen in den Vergleichskonserven. Da

* Für die freundliche Überlassung von Versuchssubstanzen sind wir der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach/Baden, den Chemiewerken Homburg, Frankfurt, der Fa. Dr. G. Henning Chem. Pharm. Werk, Berlin-Tempelhof, sowie der Pfizer GmbH, Karlsruhe, sehr zu Dank verpflichtet.

Glukokortikoide die Wirkung von Katecholaminen bei der biologischen Prüfung am Gefäßpräparat verstärken (16), mußten wir die Möglichkeit eines pharmakologischen Cortisoneffektes auf die durch Serotonin ausgelösten Kontraktionen unseres Testobjekts in Betracht ziehen. Zur Klärung wurden in Kontrollversuchen 0,1 bis 10 mg Prednisolon-Hemisuccinat/ml vor Zugabe von 5-Hydroxytryptamin (10^{-9} bis 5×10^{-8}) in die Badlösung eingebracht. Prednisolon bewirkte jedoch in diesem Dosenbereich weder eine Verstärkung noch eine Hemmung der Serotoninwirkung am isolierten Rattenuterus.

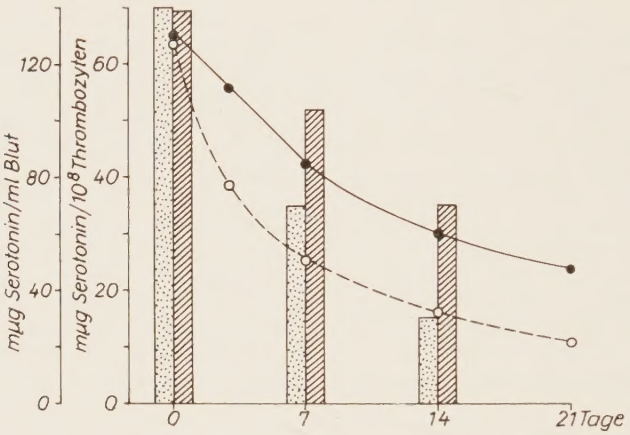

Abb. 1: Einfluß von Prednisolon auf den Blutserotonin-Gehalt und die Aminbindung der Thrombozyten. ⋯⋯ Blutserotonin-Gehalt ohne, ////// mit Prednisolonzusatz. ○---○ 5-HT-Konzentration der Thrombozyten ohne bzw. ●——● mit Prednisolon

Unter dem Zusatz von 2 mg Inosin/ml wurde der Verlauf des Aminverlustes alternder Blutplättchen im Gegensatz zu Prednisolon nicht beeinflußt; die Mittelwerte der auf 10^8 Thrombozyten errechneten 5-HT-Konzentrationen entsprachen denen der parallel geprüften Kontrollen (Abb. 2 A). Auch der Amingehalt des Vollblutes fiel mit oder ohne Inosinzusatz etwa mit gleicher Geschwindigkeit ab. Wurden dem Konservenblut Inosin, Adenin und Pyridoxol zugegeben, so sank der Thrombozyten-Serotoningehalt in den ersten 7 Tagen nach Blutentnahme etwa in gleichem Maße wie bei den Vergleichskonserven ab. Am 14. und 21. Tage fanden wir in der Versuchsreihe mit Zusatz von Nucleosiden und Vitamin B_6 etwas höhere 5-Hydroxytryptaminwerte, ohne jedoch den geringen Unterschied statistisch sichern zu können (Abb. 2 B). Kontrollversuche ließen keine konstante Beeinflussung der Serotonineffekte am Rattenuterus durch 1 bis 10 mg Inosin/ml erkennen.

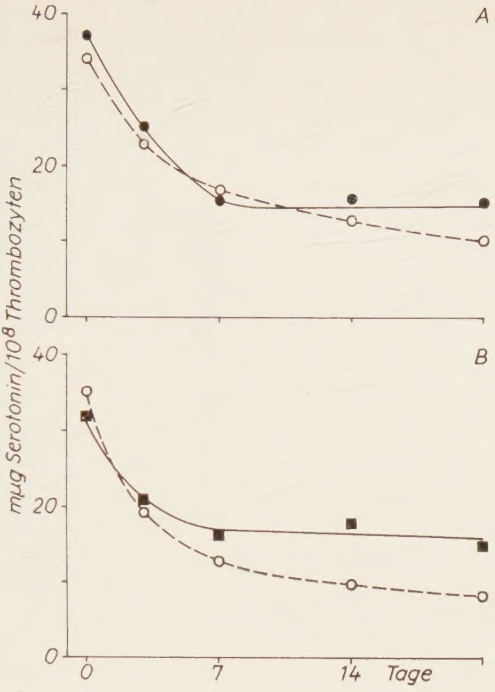

Abb. 2: Wirkung von Nucleosiden auf den Serotoningehalt der Blutplättchen.
A. ○ - - - ○ ohne bzw. ●——● mit Inosin
B. ○ - - - ○ ohne bzw. ■——■ mit Inosin, Adenin und Pyridoxol

Frühere Versuche hatten ergeben, daß der Amingehalt konservierter Blutplättchen nach Zusatz von 1 μg Serotonin/ml bei 4° C innerhalb von 24 Std. auf etwa das Dreifache des Ausgangswertes ansteigt, um sich im Verlaufe der Thrombozyten-Alterung allmählich den Kontrollen wieder anzugleichen (30). 3 Konserven derselben Blutspender wurde Inosin, 2 weiteren Konserven Inosin zusammen mit Adenin und Pyridoxol neben 5-Hydroxytryptamin zugefügt. Überraschenderweise stieg der Plättchen-Serotoningehalt bei Zugabe von 5-Hydroxytryptamin *und* Nucleosiden im Gegensatz zur Vergleichsreihe nicht an; er blieb auch im weiteren Verlauf unter den entsprechenden Werten der parallel untersuchten Blutkonserven, denen Serotonin allein zugefügt worden war (Abb. 3).

Iproniazid bzw. Nialamid wurden 5 Blutkonserven in einer Konzentration von 2×10^{-5} zugegeben; 3 Blutkonserven kamen mit einem niedriger dosierten Nialamid-Zusatz (10^{-6}) zur Untersuchung. Ferner wurden je 8 Blutkonserven der gleichen Spender aufgearbeitet, denen neben den MAO-Hemmern in der

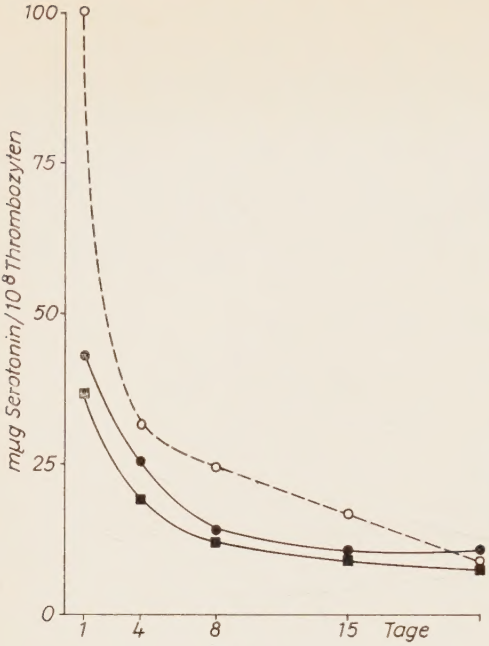

Abb. 3

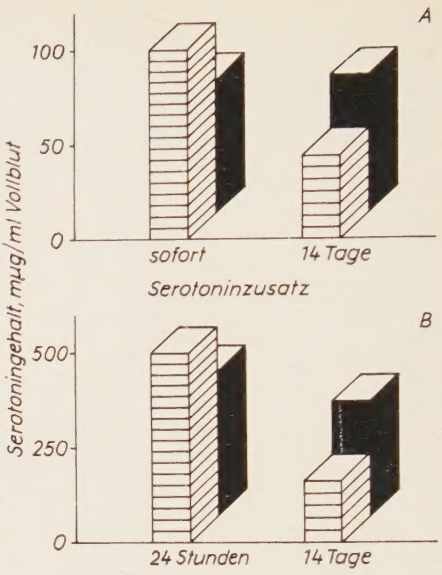

Abb. 4

Abb. 3 : Serotoningehalt der Thrombozyten bei Zusatz von 5-Hydroxytryptamin zur Blutkonserve. ○ - - - ○ ohne Nucleoside, ●——● mit Inosin, ■——■ mit Inosin, Adenin und Pyridoxol

Abb. 4 : 5-Hydroxytryptamin-Spiegel im Konservenvollblut. A = ohne, B = mit Zusatz von Serotonin. ▯▯▯ ohne, ▬▬ mit 0,5 mg Iproniazid bzw. Nialamid/ml

angegebenen Dosierung auch 1 μg Serotonin/ml zugefügt worden war. Weitere 8 Blutkonserven dienten als Kontrollen.

Mit Hilfe der biologischen Serotoninbestimmung fanden wir im Vollblut unter der Einwirkung von Iproniazid bzw. Nialamid, vor allem in der höheren Konzentration, niedrigere Ausgangswerte für 5-Hydroxytryptamin als bei den Kontrollen. Nach 14tägiger Lagerung des Blutes bei 4° C wurden in den Konserven mit MAO-Inhibitoren dagegen höhere 5-HT-Blutspiegel ermittelt. Dies war darauf zurückzuführen, daß der Serotoningehalt bei den Kontrollen abgesunken, bei Zusatz der MAO-Hemmer jedoch annähernd konstant geblieben war (Abb. 4 A). Wenn das Konservenblut einen Serotoninzusatz enthielt, so wurden im Blut nach 24 Std. Aufbewahrung bei 4° C etwa 50%, nach 14 Tagen noch etwa 16% der ursprünglichen Aminkonzentration wiedergefunden (vgl. 30). Bei gleichzeitiger Zugabe von 5-HT und MAO-Hemmern (Konz. von 2×10^{-5}) betrug der biologisch bestimmte Serotoningehalt des Blutes anfänglich

38%, nach 14 Tagen jedoch mehr als 30% des durchschnittlichen Ausgangswertes (Abb. 4 B). Wurde zu Versuchsbeginn in die Blutkonserve 1 µg Serotonin zusammen mit 0,01 mg Nialamid/ml eingebracht, so fanden wir nach 14tägiger Lagerung noch etwa 20% des zugesetzten Amins wieder.

Der 5-HT-Spiegel im plättchenarmen Plasma stieg bei den Kontrollen von kaum meßbaren Spuren auf etwa 15 bis 20 mµg/ml an und blieb während der Beobachtungsdauer von 21 Tagen dann etwa konstant. Iproniazid und Nialamid bewirkten einen stärkeren, dosisabhängigen Anstieg der Plasma-Amin-Konzentrationen (Abb. 5 A). Im Mittel wurden dabei Werte bis 60 mµg/ml erreicht. Beim Zusatzversuch mit 5-Hydroxytryptamin fielen die Plasma-Serotoninspiegel zwischen dem 2. und 21. Versuchstag anfänglich rasch, später etwas langsamer von durchschnittlich 430 auf 115 mµg/ml ab (vgl. 30). Der Verlauf der Amin-Inaktivierung wurde durch Nialamid in der Konzentration von 10^{-6} nicht beeinflußt, während höhere Dosen der Monoaminoxydase-Inhibitoren den Aminabbau verzögerten (Abb. 5 B).

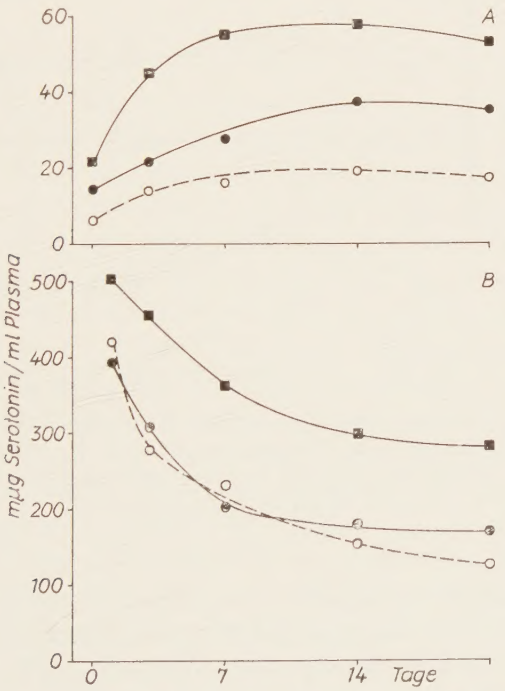

Abb. 5: Einfluß von MAO-Inhibitoren auf den Serotoningehalt im plättchenarmen Plasma. A = ohne, B = mit Serotoninzusatz. ○ - - - ○ Leerversuch, ●——● 0,01 mg Nialamid/ml, ■——■ 0,5 mg Iproniazid bzw. Nialamid/ml

In den abgetrennten Thrombozyten fanden wir mit Hilfe der biologischen Methode schon 2 Std. nach Blutabnahme und Zusatz der MAO-Hemmer Serotoninspiegel, die im Vergleich zum Leerversuch auffallend niedrig lagen und während der weiteren Untersuchung bis zum 21. Tag nach Blutentnahme etwa konstant blieben. Wurde 5-Hydroxytryptamin gleichzeitig mit Iproniazid oder Nialamid zugefügt, so kam es unter der Einwirkung der MAO-Hemmer nicht zu einem Anstieg der Aminkonzentrationen in der Thrombozytenfraktion (Abb. 6).

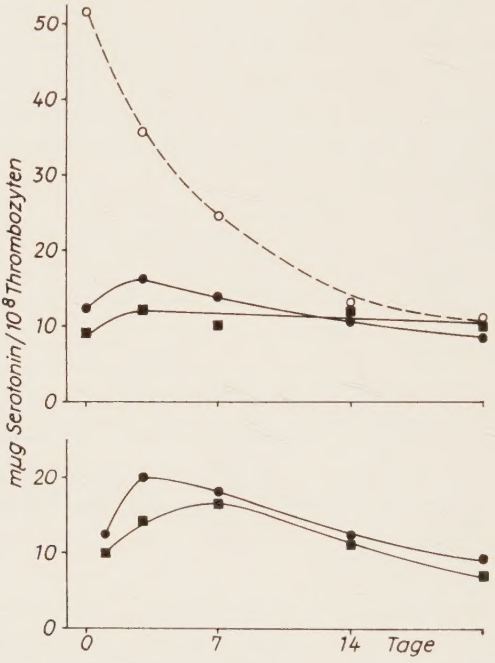

Abb. 6: Wirkung der Aminoxydasehemmer auf die biologisch bestimmte 5-Hydroxytryptamin-Konzentration isolierter Blutplättchen. ○ - - - ○ Kontrollen, ●—● 0,01 mg Nialamid/ml, ■——■ 0,5 mg Iproniazid bzw. Nialamid/ml. Unten: Zusatzversuche mit 1 μg Serotonin/ml

Die Resultate dieser Versuchsreihe, vor allem das errechnete Defizit zwischen dem Blutserotoningehalt einerseits und den Aminkonzentrationen von Plasma und Thrombozyten andererseits legten die Vermutung nahe, daß MAO-Hemmstoffe die biologische Serotoninbestimmung beeinflussen können. Tatsächlich bewirkten Iproniazid und Nialamid eine reversible Hemmung der Serotonin-bedingten Kontraktionen des isolierten Rattenuterus, deren Ausmaß und Dauer

dosisabhängig war (Abb. 7). Gleiche Konzentrationen der MAO-Hemmer bewirkten auch einen Antagonismus gegenüber Bariumchlorid und Doryl an der glatten Muskulatur, so daß die Serotonin-Inhibition nicht spezifisch war.

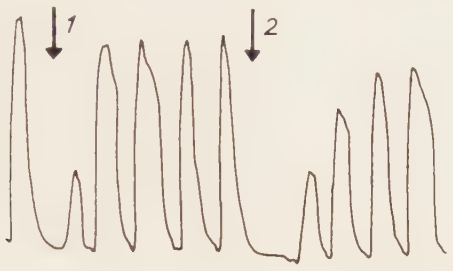

Abb. 7: Isolierter, Östrogen-sensibilisierter Rattenuterus, Kontraktionen durch 0,01 µg Serotonin/ml. Bei 1 ↓ : Zugabe von 0,1 mg Nialamid/ml vor Auslösung der Serotonin-Kontraktion, bei 2 ↓ : 1,0 mg Nialamid/ml

Diskussion

Blutplättchen lassen sich leicht schonend isolieren und eignen sich daher besonders zur Prüfung der Bindungs- und Speicherungsvorgänge biogener Amine. In vivo erfüllen sie mit der Serotonin-Bindung eine physiologische Funktion (Übersicht s. 45). Da die Plättchen das Amin nicht synthetisieren, hängt ihr 5-HT-Gehalt von der angebotenen Aminmenge und dem Speicherungsvermögen der Thrombozyten ab. Diese Plättchenfunktion ist temperaturabhängig (7, 14, 30); sie kann von Milieufaktoren (pH, Anwesenheit einzelner Ionen wie z. B. HPO_4^{-} oder K^+ sowie von Glukose oder Plasma) beeinflußt werden (8, 14, 18, 39, 41, 42). Schließlich bewirken Fermentgifte, wie Zyanid, Monojodazetat oder Dinitrophenol, sowie Reserpin, Herzglykoside, Imipramin, Cocain, Chlorpromazin, Tryptamin und andere Substanzen eine Hemmung der Aminaufnahme, wobei die bereits erwähnten Milieubedingungen offenbar die Versuchsergebnisse beeinflussen können (8, 13, 17, 22, 28, 29, 38, 39, 43). Auf Grund dieser Resultate wird neben dem Thrombozytenstoffwechsel die Beteiligung weiterer Faktoren an der Aufnahme des Serotonin und seiner Bindung in den Plättchen diskutiert. Hughes und Brodie (17), Sano und Mitarb. (28) sowie Stacey (39) vermuten ein Transportsystem an der Oberfläche der Blutplättchen. Born und Mitarb. (1, 8, 9) betonen dagegen die Bedeutung eines Speicherungsmechanismus, der mit einer Koppelung von 5-Hydroxytryptamin an ATP verknüpft ist.

In einer früheren Versuchsreihe konnten wir nachweisen, daß die anfänglich in den Thrombozyten enthaltenen Aminkonzentrationen während der Alterung abfallen. Gleichzeitig ging die Fähigkeit verloren, aus der Umgebung 5-HT gegen ein Konzentrationsgefälle aufzunehmen (30). Alternde Blutplättchen schienen sich daher für die Prüfung des Bindungs- und Speicherungsmechanismus von 5-HT mit Hilfe verschiedener Zusatzstoffe zur Blutkonserve besonders zu eignen, da die Anwendung von Fermentgiften entfiel. Gleichzeitig versprachen wir uns Resultate, die auch für die Blutkonservierung praktische Bedeutung besitzen.

Auf Grund der Thrombozytenzählungen im Konserven-Vollblut ergab sich zunächst, daß keiner der geprüften Zusatzstoffe den Zerfall von Blutplättchen während der Konservierung nennenswert beeinflußte (Abb. 8). In Anwesenheit von 5-Hydroxytryptamin, Prednisolon, Nucleosiden und Monoaminoxydasehemmern sank die Zahl der Thrombozyten bis zum 21. Tag nach Blutabnahme mit etwa gleicher Geschwindigkeit ab wie bei den Kontrollen. Dagegen fanden sich Veränderungen der Aminbindung und des 5-HT-Speicherungsvermögens der Blutplättchen, die im folgenden diskutiert werden.

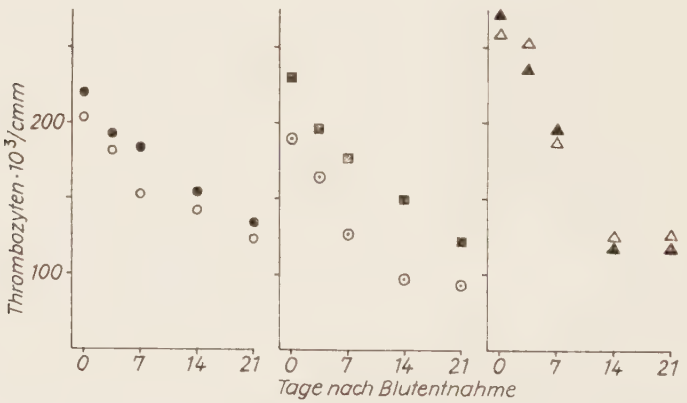

Abb. 8: Mittelwerte des Thrombozytengehaltes/µl im Konservenvollblut. ● = Kontrollversuche, ○ = Zusatz von 1 µg Serotonin/ml, ■ = 0,1 mg Prednisolon-Hemisuccinat/ml, ⊙ = 2 mg Inosin/ml, △ = 0,5 mg Iproniazid bzw. Nialamid/ml, ▲ = Zusatz von MAO-Inhibitoren und Serotonin

Glukokortikoide können nach unseren Untersuchungsergebnissen die Serotoninbindung alternder Thrombozyten erhöhen. Da das zellulär gebundene Amin dem fermentativen Abbau nicht zugänglich ist, sinkt auch der Blutserotoningehalt unter Prednisolon langsamer ab als im Kontrollversuch. Als Ursache

dieses Effekts kommt die membranstabilisierende Wirkung der Kortikoide in Frage. Für diese Annahme spricht, daß Cortisone nach neueren Befunden bevorzugt von Thrombozyten gebunden werden (15). Auch die Ergebnisse von Najean und Mitarb. (24) lassen sich damit in Einklang bringen. Nach ihren Untersuchungen wird die Überlebenszeit markierter Thrombozyten, die Patienten mit idiopathischer thrombopenischer Purpura infundiert werden, durch Glukokortikoide verlängert. Der Befund, daß Prednisolon die Abgabe des Plättchen-Serotonin in vitro verzögert, steht schließlich in Übereinstimmung mit Untersuchungsergebnissen über die Wirkung therapeutischer Glukokortikoiddosen auf den Serotoninstoffwechsel in vivo. Wir hatten beobachtet, daß die Steroidhormone, vor allem beim Patienten mit M. Werlhof, aber auch bei anderen Erkrankungen, zu einer Erhöhung des Serotoningehalts von Blut und Thrombozyten führen (32, 33, 34).

Nucleoside waren ohne Einfluß auf Amin-Bindung und -Speicherung alternder Thrombozyten. Der Unterschied gegenüber den Ergebnissen von Baldini und Mitarb. (2, 3) bzw. Gross und Mitarb. (12, 20) beruht wahrscheinlich darauf, daß wir eine andere Stoffwechsel-Teilfunktion der alternden Blutplättchen prüften. Besonderes Interesse verdient jedoch die Tatsache, daß Gross bzw. Löhr (12, 20) bei Zusatz von Inosin, reduziertem Glutathion und Nikotinsäureamid konstante Thrombozyten-ATP-Werte bis zum 21. Tag nach Blutabnahme fanden. Man könnte daraus folgern, daß der ATP-Gehalt der Blutplättchen für die Aminbindung der alternden Thrombozyten keine ausschlaggebende Bedeutung besitzt. Es fiel ferner auf, daß die Blutplättchen bei Anwesenheit von Nucleosiden kein Serotonin aus der Umgebung aufnahmen. Dies könnte darauf beruhen, daß das zugesetzte Amin von den im Überschuß anwesenden Nucleosiden gebunden wurde und so nicht von den Plättchen gebunden werden konnte.

Unsere Versuche mit Aminoxydasehemmern tragen zur Klärung des Serotonin-Abbaumechanismus in der Blutkonserve bei. Setzt man dem Plasma bei 37° C Serotonin zu, so erfolgt der Abbau durch Coeruloplasmin; Iproniazid hemmt diesen Vorgang (6, 22, 44). Nialamid und Iproniazid führten in unseren Versuchen zu einem Anstieg der Plasma-Serotoninwerte und verzögerten ihren Abfall im 5-HT-Zusatzversuch. Auch im Vollblut sank der 5-Hydroxytryptamin-Spiegel unter MAO-Inhibitoren langsamer ab als bei den Kontrollen. Damit bestätigte sich unsere frühere Vermutung, daß auch der langsame 5-HT-Abbau in der Blutkonserve bei 4° C ein fermentativer Prozeß ist.

In vivo kommt es unter der Wirkung von MAO-Inhibitoren im Tierversuch und beim Menschen zum Anstieg der Blut- und Thrombozyten-Serotonin-Werte (22, 25; Übersicht s. 26). Die Aminspeicherung frisch isolierter Blutplättchen wird nach Versuchen mit fluorimetrischer Technik (39) durch Iproniazid nicht

verändert. Mit Hilfe der biologischen Bestimmung des thrombozytären Amingehaltes fanden wir jedoch niedrigere Werte im Vergleich zu den Kontrollen sowie eine fehlende 5-HT-Speicherung in vitro. Die Möglichkeit, daß MAO-Inhibitoren an konservierten Thrombozyten eine andere Wirkung entfalten als in vivo, ist im Hinblick auf die Versuche von Stacey (39) nicht wahrscheinlich. Unsere Ergebnisse beruhen vielmehr auf einem Antagonismus der MAO-Hemmer gegenüber Serotonin am isolierten Organ. Diese Serotoninhemmung war am stärksten ausgeprägt bei der Prüfung der Thrombozytenextrakte. Sie fand sich in geringerem Maße auch im Vollblut, dagegen kaum beim Thrombozyten-armen Plasma. Daraus ergibt sich die Vermutung, daß MAO-Inhibitoren von Blutplättchen bevorzugt gebunden werden. Für eine zelluläre Fixierung dieser Fermentblocker an Erythrozyten-Stromata sprechen Untersuchungen von Rower und Werle (27). Mit der von uns vermuteten Bindung der MAO-Hemmer steht möglicherweise der Befund japanischer Autoren im Zusammenhang, wonach diese Substanzen offenbar indirekt über die Thrombozyten bzw. die Gefäßwand in Gerinnungsvorgänge eingreifen können (36, 37). Eine experimentelle Bearbeitung dieses Problems wäre für die klinische Anwendung dieser Substanzen (Übersichten s. 26, 31) von aktueller Bedeutung.

Zusammenfassung

Der Einfluß von Prednisolon, Nucleosiden und Hemmstoffen der Monoaminoxydase auf die Serotoninbindung alternder Thrombozyten wurde untersucht.

Prednisolon verzögert den Aminverlust der konservierten Blutplättchen und hemmt dadurch den Abfall des Blutserotoningehalts. Nucleoside beeinflussen den Verlauf der 5-Hydroxytryptamin-Bindung nicht. Sie behindern die Serotoninaufnahme durch die Blutplättchen im Speicherungsversuch. Unsere Versuche geben daher keinen Hinweis auf eine verbesserte biologische Überlebensdauer der Thrombozyten unter dem Einfluß dieser Stoffe.

Aminoxydase-Inhibitoren hemmen den fermentativen Abbau von 5-Hydroxytryptamin im Plasma der Blutkonserve. Sie wirken am isolierten Organ antagonistisch gegen Serotonin und beeinflussen dadurch die biologische Bestimmung des Amingehalts der einzelnen Blutfraktionen. Die Hemmung ist in der Thrombozytenfraktion am stärksten ausgeprägt. Wir vermuten daher, daß MAO-Hemmer von Thrombozyten bevorzugt gebunden werden können. Die Bedeutung des Befundes für die Therapie mit diesen Wirkstoffen wird diskutiert.

Summary

The influence of prednisolone, nucleosides and inhibitors of the monoamino-oxydase on the serotonin binding by old thrombocytes has been investigated.

Prednisolon retards the loss of amines in stored blood platelets and inhibits the decrease of serotonin concentration in blood. Nucleosides do not influence the course of fixation of 5-hydroxytryptamin. They block the accumulation of the serotonin by the thrombocytes. Our experiments do not indicate that these substances influence the platelet survival.

Amino oxydase inhibitors block the enzymatic degradation of 5-hydroxy-tryptamine in plasma of blood conserve. They act on the isolated organ as antagonists against serotonin and therefore influence the biological assay for the determination of amine concentration in the different blood fractions. The inhibition is particularly strong in the platelet fraction. We presume that the monoaminooxydase inhibitors can be electively fixed by the thrombocytes. The significance of this observation for the therapeutic use of these active substances is discussed.

Résumé

On a étudié l'influence de la prédnisolone, de nucléosides et d'inhibiteurs de la mono-amino-oxydase sur la fixation de la sérotonine par les thrombocytes vieillissants.

La prédnisolone ralentit la perte en amines des plaquettes conservées et en conséquence inhibe la chute, dans le sang, de la concentration de la sérotonine. Les nucléosides n'influencent pas les variations de fixation de la 5-hydroxy-tryptamine au cours du temps. Ils empêchent l'accumulation de la sérotonine dans les plaquettes. De nos essais il ne ressort pas que ces substances allongent le temps de survie des thrombocytes.

Les inhibiteurs de la mono-amino-oxydase bloquent la dégradation enzymatique de la 5-hydroxytryptamine dans les conserves de sang. Ils agissent comme des antagonistes de la sérotonine sur l'organe isolé et influencent le dosage biologique des amines dans les différentes fractions sanguines. L'inhibition est particulièrement marquée dans les thrombocytes. Nous en déduisons que les inhibiteurs de la mono-amino-oxydase doivent être liés électivement par les thrombocytes. La signification de cette constatation pour la thérapie avec ces substances est discutée.

(1) Baker, R., M. Blaschko and G. V. R. Born: The isolation from blood platelets of particles containing 5-hydroxytryptamine and adenosine triphosphate. J. Physiol. (Lond.) **149:** 55 P (1959).

(2) Baldini, M., and S. Ebbe: New concepts in platelet preservation. Proc., Internat. Congr. Hematol., Tokyo 1960.

(3) Baldini, M., S. Ebbe and W. Dameshek: The use of a special preservation medium for the maintenance of platelet viability at 4° C. Blood **15:** 909 (1960).

(4) Bettex-Galland, M., and E. F. Lüscher: Extraction of actomyosin-like protein from human thrombocytes. Nature **184:** 276 (1959).

(5) Bettex-Galland, M., and E. F. Lüscher: Studies on the metabolism of human blood platelets in relation to clot retraction. Thromb. Diath. haem. **4:** 178 (1960).

(6) Blaschko, H., and W. G. Levine: Enzymic oxidation of 5-hydroxytryptamine by pig serum. J. Physiol. (Lond.) **154:** 599 (1960).

(7) Born, G. V. R., and J. Bricknell: The uptake of 5-hydroxytryptamine by blood platelets in the cold. J. Physiol. (Lond.) **147:** 153 (1959).

(8) Born, G. V. R., and R. E. Gillson: Studies in the uptake of 5-hydroxytryptamine by blood platelets. J. Physiol. (Lond.) **146:** 472 (1959).

(9) Born, G. V. R., G. I. C. Ingram and R. S. Stacey: The relationship between 5-hydroxytryptamine and adenosine triphosphate in blood platelets. Brit. J. Pharmacol. **13:** 62 (1958).

(10) Burn, J. H., D. J. Finney and L. G. Goodwin: Biological standardization, 2nd ed., p. 180. London: Oxford. Univ. Press 1950.

(11) Feissly, R., et H. Lüdin: Microscopie par contrast de phase: Applications à l'hématologie. Rev. d'Hémat., Paris **4:** 481 (1949).

(12) Gross, R., G. W. Löhr und H. D. Waller: Long term preservation of functionally intact platelets. Proc. 7th Europ. Congr. Haemat., London 1959, part II, 686—691 (1960).

(13) Hardisty, R. M., G. I. C. Ingram and R. S. Stacey: Reserpine and human platelet 5-hydroxytryptamine. Experientia **12:** 424 (1956).

(14) Hardisty, R. M., and R. S. Stacey: 5-hydroxytryptamine in normal human platelets. J. Physiol. (Lond.) **130:** 711 (1955).

(15) Harrington, W. J., and M. J. Halloran: Studies on steroid binding by mammalian platelets. Proc. Internat. Congr. Haemat., Tokyo 1960.

(16) Heinemann, A. C., and T. S. Danowski: Potentiation and stabilization of aortic strip pressor assay by plasma and hydrocortisone: routine use in the diagnosis of pheochromocytoma. Am. J. Med. Sc. **239:** 167 (1960).

(17) Hughes, F. B., and B. B. Brodie: The mechanism of serotonin and catecholamine uptake by platelets. J. Pharmacol. exper. Therap. **127:** 96 (1959).

(18) Kerby, G. P., and S. M. Taylor: The role of chelation and of human plasma in the uptake of serotonin by human platelets. J. Clin. Invest. **40:** 44 (1961).

(19) Löhr, G. W., und H. D. Waller: Zellstoffwechsel und Zellalterung. Klin. Wschr. **37:** 833 (1959).

(20) Löhr, G. W., H. D. Waller und R. Gross: Beziehungen zwischen Plättchenstoffwechsel und Retraktion des Blutgerinnsels. Dtsch. med. Wschr. **86:** 897 und 946 (1961).

(21) Lüscher, E. F.: Die Thrombozyten in enzympathologischer Sicht. Referat, 7. Tag. Dtsch. Ges. Haemat., Wiesbaden 1961.

(22) Marshall, E. F., G. S. Stirling, A. C. Tait and A. Todrick: The effect of iproniazid and imipramine on the blood platelet 5-hydroxytryptamine level in man. Brit. J. Pharmacol. **15:** 35 (1960).

(23) Martin, G., N. Eriksen and E. P. Benditt: Oxidation of 5-hydroxytryptamine by human serum and its inhibition by iproniazid. Fed. Proc. **17:** Nr. 1728 (1958).

(24) Najean, Y., M. J. Larrien et J. Bernard: Survie des plaquettes marquees au radiochrome. Nouv. Rev. Franç. d'Hémat. **1:** 36 (1961).

(25) Pletscher, A., and A. Bernstein: Increase of 5-hydroxytryptamine in blood platelets by isopropyl-isonicotinic acid hydrazide. Nature (Lond.) **181:** 1133 (1958).

(26) Pletcher, A., K. F. Gey und P. Zeller: Monoaminoxydase-Hemmer. Fortschr. Arzneimittelforsch. **2:** 417 (1960).

(27) Rower, F., und H. Werle: Verhinderung der Isonicotinyl-Isopropylhydrazid (Iproniazid = Marsilid)-Hemmung der Monoaminoxydase durch Blut. Arch. exper. Path. Pharmakol. **230:** 552 (1957).

(28) Sano, I., Y. Kakimoto and K. Taniguchi: Binding and transport of serotonin in rabbit blood platelets and action of reserpine. Am. J. Physiol. **195:** 495 (1958).

(29) Sano, I., Y. Kakimoto und K. Taniguchi: Aktiver Transport der aromatischen Monoamine. Klin. Wschr. **38:** 41 (1959).

(30) Schmid, E., Ch. Meythaler, S. Witte und K. Th. Schricker: Untersuchungen über die Aminbindung bei der Alterung der Blutplättchen. Acta haematol. **26:** 1 (1961).

(31) Schmid, E., und F. Scheiffarth: Zur Anwendung von Monoaminoxydase-Inhibitoren in der Inneren Medizin. Arzneimittelforsch. **11:** 612 (1961).

(32) Schmid, E., F. Scheiffarth, L. Zicha und H. Siede: Untersuchungen über die Rolle des 5-Hydroxytryptamin bei allergischen und rheumatischen Erkrankungen sowie über die Beeinflußbarkeit des Blutserotoninspiegels durch ACTH und Glukokortikoide. Z. ges. exper. Med. **133:** 1 (1960).

(33) Schmid, E., J. Stern, S. Witte, K. Th. Schricker und N. Henning: Untersuchungen über die Thrombozytenpathologie mit Hilfe der Serotoninbestimmung. Fol. haematol. N. F. **4:** 425 (1960).

(34) Schmid, E., S. Witte, K. Th. Schricker und H. Schön: Beitrag zur Biochemie der Thrombozytopathien. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. **66:** 977 (1960).

(35) Schricker, K. Th., E. Schmid, Ch. Meythaler und S. Witte: Führt 5-Hydroxytryptamin zu Transfusionsreaktionen? Ber. 9. Tag. Dtsch. Ges. Bluttransf., Braunschweig 1960. Bibl. haemat. **12:** 351 (1961).

(36) Shimamoto, T., and T. Fujita: New type of antithrombotic effect of MAO-inhibitor in experimental thrombosis. Proc. Jap. Acad. **37:** 106 (1961).

(37) Shimamoto, T., H. Yamazaki, M. Inone, T. Fujita, N. Sagawa, T. Sunaga and T. Ishioka: Discovery of antithromboembolic effect of nialamide. Protection of "silicone-like property" of blood vessels by nialamide. Proc. Jap. Acad. **36:** 240 (1960).

(38) Shore, P. A., A. Pletscher, E. G. Tomich, R. Kuntzman and B. B. Brodie: Release of blood platelet serotonin by reserpine and lack of effect on bleeding time. J. Pharmacol. exper. Therap. **117:** 232 (1956).

(39) Stacey, R. S.: Uptake of 5-hydroxytryptamine by platelets. Brit. J. Pharmacol. **16:** 284 (1961).

(40) Waller, H. D., G. W. Löhr, F. Grignani und R. Gross: Über den Energiestoffwechsel normaler menschlicher Thrombozyten. Thromb. Diath. haem. **3:** 520 (1959).

(41) Weissbach, H., D. F. Bogdanski and S. Udenfriend: Binding of serotonin and other amines by blood platelets. Arch. Biochem. **73:** 492 (1958).

(42) Weissbach, H., and B. G. Redfield: Factors affecting the uptake of 5-hydroxytryptamine by human platelets in an inorganic medium. J. biol. Chem. **235:** 3287 (1960).

(43) Weissbach, H., B. G. Redfield and E. Titus: Effect of cardiac glycosides and inorganic ions on binding of serotonin by platelets. Nature (Lond.) **185:** 99 (1960).

(44) Zarafonetis, Ch. J. D., and J. P. Kalas: Serotonin degradation by ceruloplasmin and its inhibition by isoniazid and iproniazid. Am. J. Med. Sc. **239:** 203 (1960).

(45) Zucker, M. B.: Serotonin (5-hydroxytryptamine): Hematological aspects. Progr. Hematol. **2:** 206 (1959).

(Anschrift der Verff.: Med. Univ.-Klinik Erlangen, Krankenhausstraße 12.)

Zur Veröffentlichung eingegangen 18. 9. 1961

Der Verlag behält sich alle Rechte, besonders die des Nachdrucks, der Vervielfältigung und der Übersetzung vor.

Lebenslauf.

Am 15.Februar 1937 wurde ich als Tochter des Pfarrers Nikolaus Heß und seiner Ehefrau Amalie geb. Bäumler in Ermreuth/Ofr geboren. Nach 5jährigem Besuch der Volksschule trat ich 1949 in die 2.Klasse der Wilhelm-Löhe-Schule in Nürnberg ein. Von 1951-1955 besuchte ich die Töchterschule Zürich und legte 1956 am Neuen Gymnasium in Nürnberg die Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen, wo ich 1959 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Im Sommer 1962 bestand ich das medizinische Staatsexamen, ebenfalls in Erlangen. Seitdem bin ich als Pflichtassistentin an den Städtischen Krankenanstalten in Nürnberg tätig.

Nürnberg, im Januar 1964

Barbara Pfannmüller